



Wirtschaftspatent

Erteilt gemaeß § 29 Absatz 1 des Patentgesetzes

ISSN 0433-6461

(11)

1578 66

Int.Cl.³

3(51) C 12 N 1/26

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

21) WP C 12 N/ 2243 57

(22) 06.10.80

(45) 15.12.82

71) siehe (73)

72) GORSKAJA, LILIANA A.; SMIRNOWA, ZOJA S.; GRADOWA, NINA B.; DIBZOW, WLADIMIR P.; SU;
SILANTJEW, LEW W.; OSOKINA, NATALIA W.; GRIGORJAN, ALFRED N.; BITRICH, KONSTANTIN I.; SU;73) ADW DER DDR, INSTITUT FUER TECHNISCHE CHEMIE, LEIPZIG, DD;
VNII BIOSINTEZA BELKOVIYCH VESCESTV, MOSKWA, SU;74) ADW DER DDR, INSTITUT FUER TECHNISCHE CHEMIE, AG PATENTWESEN, 7050 LEIPZIG,
PERMOSERSTRASSE 15

54) VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON EIWEISSBIOMASSE

57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Eiweißbiomasse durch Kultivierung von Mikroorganismen auf der Basis von gasförmigen Kohlenwasserstoffen, insbesondere Methan und/oder Erdgas. Die Erfindung kann in der mikrobiologischen Industrie angewandt werden und ist in die IPK: C 12 K inzuordnen. Die Erfindung verfolgt das Ziel, ein Verfahren zu entwickeln, das sich durch eine hohe Produktivität bei erhöhter Durchflußrate auszeichnet. Es wurde gefunden, daß mit dem Bakterienstamm VSB 874 – ZMPM W – 1743 diese Zielstellung realisiert wird. Dieser Bakterienstamm wird kontinuierlich bei einer Durchflußrate von $D = 0,2$ bis $0,3 \text{ h}^{-1}$, bei einer Temperatur von 42 bis $49 \text{ }^\circ\text{C}$ und einem pH-Wert von $4,4$ bis $5,6$ unter vorzugsweise erhöhtem Druck kultiviert. Der Stamm gewährleistet eine Produktivität von 8 bis $10 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{h}$ bei einem Rohproteingehalt in der Biomasse bis 77% .

224357

Titel

Verfahren zur Gewinnung von Eiweißbiomasse

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von Eiweiß-
5 biomasse durch Kultivierung von Mikroorganismen auf der Basis
von gasförmigen Kohlenwasserstoffen, insbesondere Methan und/
oder Erdgas. Die Erfindung kann in der mikrobiologischen Indu-
strie angewandt werden und ist in die IPK : C 12 K einzuordnen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

- 10 Es sind bereits mehrere Verfahren zur Kultivierung von Mikro-
organismen, insbesondere Bakterien auf gasförmigen Kohlenwasser-
stoffen, z.B. Methan bekannt.
So wird in der US-PS 4.042.458 ein Verfahren beschrieben, in
welchen ein Stamm Methylococcus 999 auf Methan in einer Misch-
15 kultur mit heterotrophen und methylotrophen Mikroorganismen,
die von ihnen gebildeten organischen Produkte assimiliert, mit
einer Geschwindigkeit von 0,08 bis 0,09 h⁻¹ bei einer Produktivi-
tät von 2,1 g/l . h oder mit einer Wachstumsgeschwindigkeit von
0,18 und einer Produktivität von 0,9 g/ l . h gezüchtet wird.
20 Die maximale Wachstumsgeschwindigkeit bei der die Zellen ausge-
spült werden, beträgt $D_{max} = 0,31 \text{ h}^{-1}$. Hierbei beträgt die
Produktivität 0,66 g/l . h.

Die Züchtung des Stammes erfolgt bei einer Temperatur von 42°C, einem pH-Wert von 6,8 oder 7,4. Dabei enthält die gewonnene Biomasse 69 % Rohprotein. Der Einsatz von Mischkulturen führt jedoch zu einem allmählichen Verlust der Eigenschaften des Ausgangsgewisches infolge des instabilen Verhältnisses der Zellen verschiedener Stämme. Der Nachteil des individuellen Stammes besteht in seiner niedrigen Produktivität, dem Fehlen der Azidotoleranz und auch darin, daß der Rohproteingehalt in der Biomasse beim Züchten in der neutralen Zahl - pH - ungenügend ist.

Ebenfalls bekannt ist die Züchtung einer symbiotischen Bakterienkultur, die Erdgas vollständig utlisiert und die aus den Stämmen *Methylococcus capsulatus*- Stamm 2, *Methylosinus sporium* var. *incoloratus* - Stamm 4, *Methylococcus trichosporium* var. *rosacoccus* - Stamm 5 und *Warobacterium gasotypicum* - Stamm 1 besteht. (SU-US 460 745)

Mit dieser Kultur werden im diskontinuierlichen Betrieb bis 40 g/l Trockenbiomasse und im kontinuierlichen Betrieb - 10 g/l BTS bei einer Durchflußrate bis 0,16 h⁻¹ gewonnen. Die Kultur erwächst bei einer Temperatur von 33°C und einem pH von 6,7. Die erhaltene Biomasse enthält bis 75 % Rohprotein, bis 7 % Lysin, bis 3 % der schwefelhaltigen Gesamtaminosäuren und bis 12 mg/kg BTS Vitamin B₁₂. Die Nachteile der Kultur sind insbesondere, das Wachstum bei niedrigen Durchflußraten, die geringe Produktivität, die komplizierte Steuerung der symbiotischen Kultur zum Errichten eines stabilen Prozesses sowie das Fehlen der Thermo- und Azidotoleranz.

Weiterhin ist ein thermotoleranter Bakterienstamm *Methylococcus capsulatus* Tsch-MT-16 bekannt, der bei einer optimalen Temperatur 38 bis 39°C und einen pH-Wert von 6,6 bis 6,8, einer Durchflußrate von D = 0,12 h⁻¹ und einer Biomassekonzentration von 10 g/l BTS wächst und eine Produktivität von 1,2 g/l gewährleistet. (SU - US 467 620).

Die Infektion des Stammes durch die Begleitflora betrug im unsterilen Betrieb 24 %.

Der Nachteil des Stammes ist insbesondere in dem Fehlen der Azidotoleranz zu sehen sowie der unzureichenden Optimaltemperatur beim Wachsen bei niedriger Durchflußrate, der geringen Produktivität und dem verhältnismäßig hohen Infektionsgrad.

- 5 In der GB-PS 1.463.295 ist ein Stamm *Methylococcus capsulatus* ATSS 19069 beschrieben, der zum ersten Mal 1966 von Foster und Davis (J.W. Foster, R.H. Davis, 1966, Z. Bact. Vol. 91, 1924) isoliert wurde.

10 Die kontinuierliche Züchtung dieses Stammes erfolgt bei einer optimalen Temperatur von 45°C und einem pH-Wert von 6,5, einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,15 h⁻¹. Dabei werden unter unsterilen Wachstumsbedingungen eine Zelldichte von 11,7 kg/m³ und eine Produktivität von 1,76 kg/m³.h erreicht. Gemäß einer anderen GB-PS (1.421.135) wuchs der Stamm

- 15 *Methylococcus capsulatus* unter unsterilen Bedingungen unter den gleichen Verhältnissen (pH 6,5 und Temperatur 45°C) bei einer Durchflußrate von 0,18 h⁻¹ und einer Zelldichte 13,7 g/l (Produktivität 2,5 g/l.h). Die erhaltene Biomasse enthielt 72,5 % Rohprotein. Der Nachteil dieser Stämme besteht darin, 20 daß der optimale pH-Wert in etwa dem neutralen Wert entspricht und die Stämme bei ungenügender Durchflußrate wachsen.

Somit kann gesagt werden, daß die in den bekannten Verfahren verwendeten Stämme folgende Nachteile aufweisen:

- 25 Geringe Wachstumsgeschwindigkeit beim Durchfluß des Mediums, niedrige Produktivität, neutralen pH-Wert oder ihm nahekommenden optimalen Wert, Fehlen der Konkurrenzfähigkeit sowie niedrige Resistenz gegen Infektionen und Stoffwechselzwischenprodukte. Auf Grund dessen wurden sie in einem Gemisch mit heterotrophen Mikroorganismen und bei kleinen Biomassekonzentrationen im 30 Kulturmedium gezüchtet.

Weiterhin ist ein technisches Verfahren bekannt unter Verwendung eines Stammes *Methylococcus capsulatus* (GB-PS 1 397 735).

Dieser Stamm wächst bei einer Temperatur von 45° C, einem pH-Wert von 6,1 und einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,18 h⁻¹.

Der Stamm erzeugt 14 g/l Biomasse und gewährleistet eine Produktivität von 2,5 g/l.h.

Der Nachteil dieses Stammes bezieht sich auf das Fehlen der Azidotoleranz, dem Wachsen bei einer niedrigen Durchflußrate und der niedrigen Produktivität.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, ein Verfahren zu entwickeln, das sich durch eine hohe Produktivität bei erhöhter Durchflußrate auszeichnet.

Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine Produktionskultur zu selektieren und einzusetzen, die eine Azido-Thermotoleranz besitzt.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein bei einer Stufen-Autoselektion unter kontinuierlichen Bedingungen aus den Abwässern der Erdölbohrung in der ASSR selektierter und als ein zur Gattung *Methylococcus capsulatus* identifizierten Stamm (nach I.W. Foster, K.H. Davis 1966, I of Bacteriology, vol 91, p. 1924) als Produktionsstamm verwendet wird.

Der Stamm unterscheidet sich vom Standardtyp durch eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit der Kolonien und durch deren Größe, durch ein höheres Temperaturoptimum, die Azidotoleranz, durch die Bildung von Tetrakokken, Fixierungsfähigkeit von atmosphärischen Stickstoff und der oligonitrophilen Eigenschaft.

Der erfindungsgemäß vorgeschlagene Stamm unterscheidet sich von den bisher bekannten Stämmen durch die Wachstumsfähigkeit bei erhöhter Durchflußrate ($D = 0,25$ bis $0,3 \text{ h}^{-1}$), der Gewährleistung einer hohen Produktivität (8 bis $10 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{h}$) sowie durch die vorhandene Azido-Therm-Toleranz, d.h. durch seine

Wachstumsfähigkeit bei einem pH-Wert des Mediums von $4,4$ bis $5,6$ und bei einer Temperatur von 42 bis 49°C bei einer Durchflußrate von $D = 0,2$ bis $0,3 \text{ h}^{-1}$.

Weiterhin unterscheidet sich der Stamm von den bisher bekannten Stämmen durch seine Barotoleranz, d.h. durch seine Wachstumsfähigkeit bei erhöhtem Druck (7 bis 12 atm), wobei er Druckabfälle verträgt und eine hohe Biomassekonzentration im
5 Medium (bis 60 g/l Trockensubstanz unter kontinuierlichen Bedingungen und bis zu 100 g/l unter diskontinuierlichen Bedingungen) gewährleistet. Der Stamm ist gegen Beimengungen von Methanhomologen (10 bis 15 %) und gegen Schwefelverbindungen (20 mg/m³), bezogen auf Schwefel im Erdgas resistent. Er kann
10 eine Biomasse mit einem Rohproteingehalt bis 77 % produzieren.

Der Stamm trägt die Bezeichnung - *Methylococcus capsulatus* WSB-874 - und wurde zum Zwecke der Aufbewahrung in die Kultursammlung des Museums für Kulturen industrieller Mikroorganismen des Institutes "WNIIGenetika", unter der Kollektionsnummer -
15 ZMPM W - 1743 - registriert und hinterlegt.

Morphologische Merkmale

Zellen haben die Form von Kokken, Ø 1 mkm oder von Diplokokken, Abmessung 1 x 2 mkm, unbeweglich, mit einer Mikrokapsel umgeben, gramnegativ. In der alten Kultur (10 Tage) bilden sich Makro-
20 kapseln. Im kontinuierlichen Prozeß, der bei atmosphärischem Druck und Überdruck durchgeführt wird, haben die Zellen unter optimalen Bedingungen die beschriebene Form und die angeführte Größe. In Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen liegt der Durchmesser der Kokken im Bereich von 0,7 bis 1 mkm. Bei un-
25 günstigen Verhältnissen, bezogen auf das Wachsen, liegen die Zellen in Form von Tetrakokken mit einem Ø von 2 mkm vor, sie sind dunkel im Phasenkontrast.

Merkmale der Kultur

Kolonien auf Mineralagar konvex, glänzend, glatt, cremefarben,
30 kugelig mit glattem Rand, Durchmesser am zweiten Tag 1 mm und fünften Tag 2,5 mm. Sie bilden kein wasserlösliches Pigment.

Physiologische Merkmale

- Der Aerobier wächst im Temperaturbereich von 30 bis 50°C und bei einem pH-Wert von 4 bis 8. Optimale Temperatur bei kontinuierlicher Kultivierung 42 bis 45°C und optimaler pH-Wert 5 bis 5,6.
- Als Kohlenstoffquelle wird reines Methan oder Erdgas und Methanol in einer Konzentration von 0,01 bis 0,025 % eingesetzt, kein Wachstum auf organischen Medien (Fleischpeptonagar, Kartoffelagar und Würzeagar), d.h. er ist ein Obligatmethyloph. Er assimiliert Hexan auf dem Hexulosephosphatweg.
- Verhältnis zur Stickstoffquelle. Er verwertet die Ammonium-, Nitrat-, Amin- und Amidformen der Stickstoffquellen, fixiert atmosphärischen Stickstoff. Er besitzt oligonitrophile Eigenschaften, d.h., er kann bei kleinen Stickstoffmengen im Medium wachsen.
- Verhältnis zu den Wachstumsfaktoren. Es liegt kein Bedarf an Vitaminen und sonstigen Wachstumsstimulatoren vor. Es handelt sich um einen nichtpathogenen Stamm und ist, bezogen auf andere Mikroorganismenarten konkurrenzfähig.
- Die Besonderheiten des Stammes gewährleisten ein stabiles Wachsen unter kontinuierlichen Bedingungen bei einer hohen Geschwindigkeit und Produktivität sowie die Konkurrenzfähigkeit, Infektionsresistenz, eine hohe Biomassequalität und eine Erhöhung der Effektivität des Prozesses.
- Die Erfindung wird anhand folgender Beispiele, die die Wachstumsbedingungen des Stammes nicht begrenzen, illustriert dargestellt.

Beispiel 1

- Die Kultur *Methylococcus capsulatus* Stamm WSB-874 wurde in einem Turbostrahlfermentor mit einem Volumen von 40 l (Betriebsfüllung 20 l) bei Verwendung eines Mineralnährmediums in folgender Zusammensetzung gezüchtet:

Beispiel 1

	0,05 ml/l	H_3PO_4 (80 %ig)
	0,02 g/l	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
	0,025 g/l	KCl
5	0,3 mg/l	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
	1,9 mg/l	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$
	1,0 mg/l	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$
	0,048 mg/l	$CoSO_4 \cdot 7H_2O$
	0,10 mg/l	$NiSO_4 \cdot 7H_2O$
10	0,20 mg/l	$Al_2(SO_4)_3 \cdot 4H_2O$
	0,085 mg/l	$CrCl_3 \cdot 2H_2O$
	1,25 mg/l	H_3BO_3
	2,1 mg/l	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$
	0,045 mg/l	$Na_2MO_4 \cdot 2H_2O$

15 Als Stickstoffquelle und zur Einstellung des pH-Wertes wurde Ammoniakwasser verwendet.

Der Erdgas- und Luftverbrauch pro 1 l Kulturmedium betrug 15 und 45 l/h.

Die Züchtung wurde bei einem atmosphärischen Druck, einer Temperatur von 45°C, einem pH-Wert von 5,0 und einer Durchflußrate von 0,25 h⁻¹ durchgeführt.

Dabei betrug die Biomassekonzentration 11 g/l Trockensubstanz (BTS), der Rohproteingehalt - 77 %.

Unter unsterilen Bedingungen betrug die Infizierung durch die Begleitflora 8 %.

Beispiel 2

Die Züchtung erfolgte auf einem Nährmedium, das im Beispiel 1 angegeben ist. Die Temperatur betrug 45°C und der pH-Wert 5,5 bis 5,6. Der Erdgas- und Luft-Verbrauch beträgt 25 und 100 m³/h pro m³ Medium.

Die Züchtung wurde unter einem Druck von 7 ata durchgeführt.

Dabei wurde eine Produktivität von $6,2 \text{ kg/m}^3 \cdot \text{h}$ bei einer Wachstumsrate von $0,27 \text{ h}^{-1}$ und einer Konzentration der Biomasse von 23 kg/m^3 Trockensubstanz BTS erhalten.

Der Infektionsgrad durch die Begleitflora betrug 10% . Roh-
5 proteingehalt 77% .

Beispiel 3

Die Züchtung der Bakterien wurde im diskontinuierlichen Betrieb auf einem im Beispiel 1 angeführten Nährmedium bei einer Temperatur von 42°C und einem pH-Wert von $5,5$, bei einem Druck von 5 ata durchgeführt. Der Erdgas- und Luft-Verbrauch beträgt entsprechend 30 und $120 \text{ m}^3/\text{h}$ pro m^3 .

Der Druck wurde bis zum Erreichen einer Biomassekonzentration von 10 kg/m^3 BTS gesteigert. Dabei wurde eine Biomassekonzentration von 100 kg/m^3 BTS in 40 Stunden erreicht.

224357

Erfindungsanspruch

Verfahren zur Gewinnung von Eiweißbiomasse durch Kultivierung von Mikroorganismen auf der Basis von gasförmigen Kohlenwasserstoffen, insbesondere Methan und/oder Erdgas, dadurch gekennzeichnet, daß der Bakterienstamm WSB 874 - ZMPM W - 1743
5 kontinuierlich bei einer Durchflußrate von $D = 0,2$ bis $0,3 \text{ h}^{-1}$ bei einer Temperatur von 42 bis 49°C und einem pH-Wert von $4,4$ bis $5,6$ und unter vorzugsweise erhöhtem Druck, kultiviert wird.